

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00559

## 生物样品电镜超薄切片染色技术的改进

唐凯<sup>1,2△</sup>, 叶煦亭<sup>2△</sup>, 范晓燕<sup>2</sup>, 晋若冰<sup>2</sup>, 林方兴<sup>2</sup>, 金婵<sup>2</sup>, 汤莹<sup>2</sup>, 马春旺<sup>1</sup>, 杨勇骥<sup>2\*</sup>

1. 河南师范大学物理与信息工程学院物理学系, 新乡 453007
2. 第二军医大学基础部生物物理研究所, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 提高透射电镜生物样品超薄切片的染色效率和染色质量。**方法** 在传统染色方法基础上进行改进, 采用“插入式滴染法”和连续染色方式。**结果** 在较短时间内完成大批生物样品超薄切片的电子染色。**结论** 与传统方法相比省时省药, 减少污染概率, 电镜观察结构清晰, 反差较好。

**[关键词]** 透射电子显微镜检查; 生物样品制备; 超薄切片染色

**[中图分类号]** R 35-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0559-02

### Improvement in specimen preparation of ultra-thin section staining for transmission electron microscopy

TANG Kai<sup>1,2△</sup>, YE Xu-ting<sup>2△</sup>, FAN Xiao-yan<sup>2</sup>, JIN Ruo-bing<sup>2</sup>, LIN Fang-xing<sup>2</sup>, JIN Chan<sup>2</sup>, TANG Ying<sup>2</sup>, MA Chun-wang<sup>1</sup>, YANG Yong-ji<sup>2\*</sup>

1. Department of Physics, College of Physics and Information Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China
2. Institute of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To improve the staining efficiency and quality of biological specimens ultra-thin section for transmission electron microscopy. **Methods** The “plug-in staining method” and continuous staining were developed by modifying the traditional staining method. **Results** Using our method, we completed the electron staining of a large number of ultra-thin sections of biological specimens of within a short period of time. **Conclusion** Compared with traditional method, the new method can save time and drug, and reduce the possibility of staining contamination. The ultrastructure observed by electron microscope is more clear and distinct.

**[Key words]** transmission electron microscopy; specimen preparation; ultra-thin section's staining

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5): 559-560]

透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)生物样品制备大致分为取材、固定、漂洗、脱水、浸透、包埋、修块、定位、超薄切片及染色等多个步骤。所有这些步骤环环相扣, 缺一不可。超薄切片染色是电镜生物样品制备的最后一步, 染色好坏直接影响到电镜照片的质量。在透射电镜生物样品制备过程中, 由于生物样品本身的反差低, 需要经过重金属染色才能在电镜下显示清晰的超微结构。利用重金属离子对不同细胞结构的结合能力不同, 使细胞内各结构对电子产生不同的散射能力, 显示在荧光屏上产生不同的反差<sup>[1-2]</sup>。通常都采用铀-铅双染法进行染色, 由于该染色方法影响因素较多, 结果常不稳定, 故人们对染色液、染色方法和染色工具做了许多改进与探索<sup>[3-5]</sup>。

本研究采用插入式滴染法, 有效减少染色污染, 提高染色质量, 为获得高质量生物样品透射电镜图谱提供保障。

### 1 材料和方法

1.1 材料 预备的 2%醋酸铀水溶液, 用锡纸包好, 暗处静置。将容量瓶中的枸橼酸铅溶液调至 pH 12, 用封口膜密封(防止铅溶液与空气中的二氧化碳接触形成不溶性碳酸铅沉淀), 置于 4℃冰箱中待用。

1.2 染色方法 染色间保持洁净, 室温保持在 25℃左右。为了减少空气中颗粒物的影响, 染色时应尽量减少人员走动。(1)用无纤维滤纸做成的小漏斗过滤醋酸铀染液, 在培养皿的蜡片上形成小液滴, 将载有生物样品的铜网插入到醋

**[收稿日期]** 2011-01-14 **[接受日期]** 2011-03-29

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(2006CB932505), 上海市科委纳米专项基金(0752nm020), 河南师范大学青年基金(2009qk07)。Supported by National Program on Key Basic Research Projects(2006CB932505), Nanotechnology Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(0752nm020), and Youth Foundation of Henan Normal University(2009qk07)。

**[作者简介]** 唐凯, 硕士生。E-mail: tangkai0311@126.com; 叶煦亭, 高级实验师。E-mail: xuting\_3@hotmail.com

△共同第一作者(Co-first authors)。

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com

酸铀染液滴中(使样品完全浸没于醋酸铀染液中),盖上培养皿,一般染色 30 min。(2)醋酸铀染色结束后,用镊子将铜网从醋酸铀滴中夹出并用 3 个烧杯依次漂洗,每个烧杯漂洗 10~15 下,用三角形小滤纸插到镊子的两夹中间,从铜网的上部吸去多余的水分。(3)用滤纸过滤枸橼酸铅溶液,在蜡片上形成小液滴(蜡片周围事先放几片氢氧化钠,以吸收培养皿内的二氧化碳,减少碳酸铅形成),用镊子夹住铜网插入到枸橼酸铅染液滴中进行染色。一般的细胞和组织样品枸橼酸铅染色时间为 7 min,蛋白和 DNA 等样品则染色 10 min。(4)枸橼酸铅染色结束后,将铜网在新鲜的双蒸水中清洗(操作方法同上)。

2 结果和讨论

2.1 生物样品染色与未染色的差别 超薄切片的染色是一种“电子染色”,它只显示黑白的对比。透射电镜图像本质上是电子密度的差异,它是由于样品不同部位对电子束的散射能力不同而形成的。散射的电子数越多,图像越暗;反之,散射的电子数越少,图像越亮。组成生物样品的碳、氢、氧、氮等元素的原子序数较低,散射电子能力较弱。未经染色的超薄切片在电镜下反差很低,生物样品的超微结构显现不清(图 1A、1B),而经过铀铅染色后生物样品的超微结构清晰可见(图 1C、1D)。由此可见,为了更加清晰地呈现生物样品中的信息,需要在透射电镜观测之前对样品进行染色。

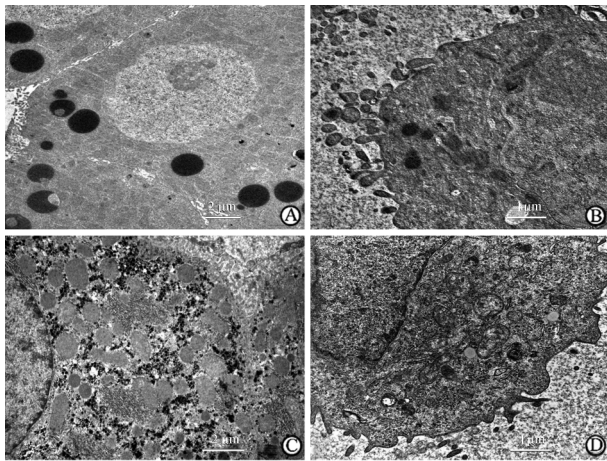


图 1 未染色和染色的生物样品

Fig 1 Non-dyed and dyed biological samples

A, C: Liver tissue; B, D: A549 cells; A, B: Not dyeing; C, D: Dyeing

2.2 插入式滴染法的优点 目前,一部分人采用加工过的铜网盒进行大批量样品染色<sup>[6]</sup>。如果铅溶液本身已污染,该方法将造成整批切片的污染;另外,由于网格的存在,残留在网格内的染液往往不易洗净,也会造成污染。也有人采用漂浮式液滴法<sup>[7]</sup>,即将铜网的切片面朝下倒扣在染色滴上。此法操作费时,在倒扣前还要先确认切片在铜网的哪面。其次,切片只有一面与染液接触,染色不充分,且液滴表面易干燥,接触空气多,容易造成污染。为了避免上述方法存在

的问题,本实验中心对染色方法进行改进,将载有样品的铜网直接插至染液的液滴中,我们称之为插入式滴染法。该方法不仅能使切片双面与染液充分作用,将切片与空气隔离,有效地阻止污染,而且染液用量省,降低了铀、铅对环境污染的可能性。

2.3 连续染色方式 我们采用连续染色方式来提高染色效率:准备两套染色用具,在上一批样品染铀 15 min 后,将后一批样品移入铀滴中,1 h 内就可以染 24 片铜网,效率比以前提高 1 倍。

2.4 微波辅助染色 在温度较低的情况下,染色时需要加微波助染<sup>[8]</sup>。要获得稳定的、令人满意的微波染色结果,控制好微波辐射的功率和时间非常重要。微波辐射时间过短,图像反差弱,结构显示不清;辐射时间过长则会出现胞质基质上色过深,膜性结构显示不清,严重者出现粒化和污染沉淀。目前,使用松下 IEC-705 型家用微波炉,工作频率 2 450 MHz,最大输出功率 800 W,分三档可调。使用时在炉内转盘上对称的两侧靠边各放一烧杯(250 ml)水,吸取多余微波能。微波助染,染铀, MED 档, 10 s;染铅, MED 档, 10 s。

2.5 注意事项 (1)在操作过程中应尽量减少暴露在空气中的时间;戴口罩、屏呼吸等,尽量减少呼出二氧化碳与铅染液形成沉淀,造成污染。(2)取铅、铀染液时,用吸管轻轻取溶液中部的染色液,避免吸取瓶底的沉淀和染色液表面可能出现的污染物质;吸取染液过程需一次性完成;滴管中铅染液的第一滴与最后一滴因已与空气接触,应弃去不用,多余的染色液弃去,不可再放回瓶中;每次吸取染液后应及时盖上瓶盖。(3)整个染色过程要保持有切片的铜网面朝上,染色液滴不宜太小,确保铜网完全浸没在液滴中,操作完毕后,将铜网放回培养皿中。(4)染色完成后将用过的漏斗、滤纸、蜡片等沾有铅和铀染液的废弃物置于专门的回收桶中,由专业部门回收。铅液经封口膜密封再放回 4℃ 冰箱。(5)染色时尽量避免风直接吹染液。

[参考文献]

[1] 杨勇骥.实用生物医学电子显微镜技术[M].上海:第二军医大学出版社,2003:94-95.  
 [2] 应国华.电镜技术与细胞超微结构[M].香港:香港现代出版社,1983:51-52.  
 [3] 陈文列,钟秀容.介绍一种稳定的改良三铅染色液[J].细胞生物学杂志,1989,2:11.  
 [4] 王 鹏,陈明霞,樊小军,刘衍晟.一种减少超薄切片污染的简单方法[J].电子显微学报,2006,25:279.  
 [5] 杨 怡,汪宝珍,张 飒.一种用硅橡胶载网夹进行超薄切片染色的有效方法[J].电子显微学报,2005,24:236-237.  
 [6] 孟 丽,崔 芳,龚 森,武惠珍.透射电镜电子染色方法的改良[J].电子显微学报,2010,29:189-190.  
 [7] 高美钦.超薄切片的漂浮染色法及避免污染要点[J].福建医科大学学报,1998,32:114.  
 [8] 陈文列,陈莲云,钟秀容.超薄切片的微波辅助快速染色法[J].电子显微学报,1994,5:385.